

Rec'd PCTO 13 SEP 2004

10/507414  
13.08.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 01 AUG 2003

WIPD BET

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    4 月 2 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 1 2 5 8 8 1  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 1 2 5 8 8 1 ]

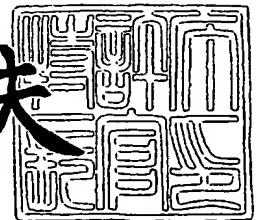
出      願      人                      鐘 淵 化 学 工 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年    7 月 1 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 6 5 8 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4770

【提出日】 平成14年 4月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/62

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県明石市別所町 1 2 - 3 2 メゾン別所 2 0 1

    【氏名】 宮本 憲二

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7

    【氏名】 小川 典子

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市大安寺東町 1 7 - 7

    【氏名】 小坂田 史雄

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町 1 1 - 3 3

    【氏名】 松本 圭司

【特許出願人】

    【識別番号】 000000941

    【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

    【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005027

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項１】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物から、微生物菌体を破碎してポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を分離する工程において、ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液を攪拌しつつ、物理的破碎処理とアルカリ添加を同時に行うことを特徴とする、ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項２】 pHをコントロールしながら、連続的又は断続的にアルカリを添加することを特徴とする請求項１記載の製造方法。

【請求項３】 pHを１０～１２の間にコントロールすることを特徴とする請求項２記載の製造方法。

【請求項４】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸が、D－３－ヒドロキシヘキサノエート（３HH）と他の３－ヒドロキシアルカン酸との共重合体である請求項１～３記載の製造方法。

【請求項５】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸が、D－３－ヒドロキシブチレート（３HB）とD－３－ヒドロキシヘキサノエート（３HH）との２成分共重合体、または、D－３－ヒドロキシブチレート（３HB）とD－３－ヒドロキシバレレート（３HV）とD－３－ヒドロキシヘキサノエート（３HH）との３成分共重合体である請求項４記載の製造方法。

【請求項６】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエである請求項４又は５記載の製造方法。

【請求項７】 ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリ－３－ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子を導入された菌株である請求項４又は５記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明はポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を、微生物菌体から分離精製する方

法に関するものである。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸（以後PHAと称す）は多くの微生物種の細胞にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、生分解性を有している。現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋め立てなどにより処理されているが、これらの処理方法には地球の温暖化や埋立地の地盤弛緩等の問題点がある。そのためプラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際には、プラスチック廃棄処理方法としては、焼却、埋立、リサイクルだけでは対応しきれず、自然界に放置されたままになるものも多いのが現状である。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害とされないPHAの様な生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望されている。特に、微生物が菌体内で生成蓄積するPHAは、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響がほとんどないと予想されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能と考えられる。

#### 【0003】

微生物が生成するPHAは、通常顆粒体を形成してその微生物の菌体内に蓄積されるため、PHAをプラスチックとして利用するためには、微生物の菌体内からPHAを分離して取り出すという工程が必要である。PHAを微生物菌体から分離精製する既知の方法として、大別すると、PHAが可溶である有機溶媒を用いて菌体からPHAを抽出する方法と、PHA以外の菌体構成成分を破碎もしくは可溶化させて除くことによりPHAを得る方法に分けられる。

#### 【0004】

有機溶媒による抽出を利用したPHAの分離精製方法では、PHAが可溶である溶媒として、例えば1, 2-ジクロロエタンやクロロホルムといったハロゲン含有炭化水素を用いて抽出する方法がある（特開昭55-118394号、特開昭57-65193号）。しかし、これらハロゲン含有炭化水素は疎水性溶媒で

あるため、抽出前に、菌体を予め乾燥する等の、溶媒が菌体中のPHAと接触できるようにするための工程が必要となる。また、これらの方法においてはPHAを実用に値する濃度（たとえば5%）以上に溶解すると抽出液は極めて粘重となり、溶解しなかった菌体残渣とPHAを含む溶媒層との分離が非常に困難である。更に、溶媒層からPHAを高い回収率で再沈殿させるためには溶媒層の4～5倍容のメタノールやヘキサン等のPHA不溶性溶媒が必要であるなど、再沈殿工程には大容量の容器が必要とされる。さらには、溶媒の使用量が膨大なため、溶媒の回収コストと損失溶媒のコストがかさむことになる。加えて近年、環境保護の観点から有機ハロゲン化合物の使用は制限される方向にあり、この方法での工業化は難しいのが現状である。

#### 【0005】

そこで、PHAが可溶でありかつ水と混ざり合う溶媒、例えばジオキサン（特開昭63-198991号）またはプロパンジオール（特開平02-69187号）またはテトラヒドロフラン（特開平07-79788号）の様な親水性溶媒を用いた抽出方法も提案されている。これらの方法は乾燥菌体や湿菌体からでもPHAを抽出することが可能な点と、菌体残渣と分離した溶媒層を冷却するだけでPHAの沈殿物が得られる点では好ましいと考えられる。しかし、これらの方法でもPHAの溶解した溶媒層の粘重性の問題は解決されておらず、加えて抽出効率を上げるためには加熱が必要であり、水存在下で加熱するためにPHAの低分子化が避けられないことや、回収率が劣ることなどの欠点を有している。

#### 【0006】

一方、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る方法として、J. Gen. Microbiology, 19, 198-209頁（1958）には、菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理してPHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、プロセスとしては簡単ではあるが、大量の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があるためにコストが高くなる。また、PHAの著しい低分子化が引き起こされることや得られたPHA内に無視できない量の塩素が残存することから実用には適さないと考えられる。特公平04-61638号には、PHAを含有する微

生物菌体懸濁液を100℃以上で熱処理することで菌体構造を破壊し、次いでタンパク質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理とを組み合わせ、PHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、熱処理によってタンパク質が変性・不溶化するために、次のタンパク質分解酵素処理工程での負荷が増大すること、更には、処理工程が多く複雑であること等の欠点を有している。

#### 【0007】

また、PHA含有微生物菌体を破碎する方法として、界面活性剤で処理したのち、菌体から放出された核酸を過酸化水素処理して分解し、PHAを分離する方法が提案されている（特表平08-502415号）が、界面活性剤を含む廃液は発泡が激しいことに加えて高いBOD負荷値を持つ。このような観点から界面活性剤の使用は工業的規模において望ましくない。

#### 【0008】

また、PHA含有微生物菌体を高圧ホモジナイザーで破碎してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-177894号、特開平07-31488号）。しかし、これらの方法は微生物菌体懸濁液を少なくとも3回、場合によっては加温して10回も高圧処理しなければ純度の高いPHAを得ることは出来ず、なおかつ得られるPHAの純度は65～89%程度と低いという欠点がある。また、PHA含有微生物懸濁液にアルカリを添加して加熱し、細胞を破碎してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-31487）。しかし、得られるポリマーの純度は75.1～80.5%と低く、収率向上のためにアルカリ添加量を増やすとポリマーの低分子化が起こるなどの欠点があった。さらに、アルカリ添加後に物理的破碎を行う方法もいくつか提案されているが（Bio separation、2,95-105項、1991. 特開平07-31489）、アルカリ処理だけでは菌体構成成分は少量しか菌体外に出ておらず、続く高圧破碎処理後でも菌体構成成分がPHA画分に残存しており効率的でないこと、従って微生物菌体懸濁液を少なくとも5回高圧処理しなければ純度の高いPHAを得ることは出来ず、なおかつ得られるPHAの純度は77～85%程度と低いという欠点がある。加えて、アルカリを添加する方法においては、一般に

、微生物菌体から流出する菌体成分、特に核酸が、菌体懸濁液の粘度を上昇させ、その後の処理が困難になるという問題があった。

#### 【0009】

また、PHA含有微生物懸濁液をpH2未満の酸性に調整し50度以上でPHAを分離する方法が提案されている（特開平11-266891）。しかし、この方法はpH2未満のような強酸性で処理を行うために工業的規模では望ましくないこと、純度向上のためには酸処理の後にアルカリ性に調整する必要があり大量の塩が発生すること、また、得られるPHAの分子量が247万から100万程度にまで低下するなどの欠点を有している。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来技術における上記の課題を解決し、PHA含有微生物菌体からPHA以外の菌体構成成分を効率よく除き、少ない工程数で深刻な分子量の低下を起こすことなく高純度のPHAを高収率で得ることのできるPHAの分離精製方法を提供することにある。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、PHAの工業的に有利な生産方法について鋭意検討した。その結果、(i) PHAを含有する微生物菌体の懸濁液を攪拌しつつ、物理的破碎処理と同時にアルカリを添加することによって、微生物菌体から漏洩したPHA以外の菌体構成成分による懸濁液の粘度の向上を防げること、(ii) 菌体懸濁液の粘度向上を防ぐことによってpHのコントロールが可能となり、(iii) さらに、アルカリを連続的あるいは断続的に添加することで、低いアルカリ濃度で処理が行えるため、著しい分子低下を起こすことなく、高純度のPHAが分離できることを見だし、本発明に到達した。

#### 【0012】

すなわち本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアリカン酸を含有する微生物から、微生物菌体を破碎してポリ-3-ヒドロキシアリカン酸を分離する工程において、ポリ-3-ヒドロキシアリカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液を攪拌しつつ

、物理的破碎処理とアルカリ添加を同時に行うことを特徴とする、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。

#### 【0013】

その好ましい実施態様としては、pHをコントロールしながら、連続的又は断続的にアルカリを添加することを特徴とする上記製造方法に関し、より好ましくは、pHを10～12の間にコントロールすることを特徴とする上記製造方法に関する。

#### 【0014】

別の好ましい実施態様としては、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)と他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体である上記製造方法、より好ましくは、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合体、または、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシバレレート(3HV)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との3成分共重合体である上記製造方法に関する。

#### 【0015】

また別の好ましい実施態様としては、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ、あるいはアエロモナス・キャビエ由来のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子を導入された菌株である上記製造方法に関する。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に用いられる微生物は、細胞内にPHAを蓄積している微生物であれば特に限定されない。例えば、*A. lipolytica*、*A. eutrophus*、*A. latus*等のアルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、シユウドモナス属(*Pseudomonas*)、バチルス属(*Bacillus*)、アゾトバクター属(*Azotobacter*)、ノカルディア属(*Nocardia*)、アエロモナス属(*Aeromonas*)の菌が挙げられるが特に、*A. caviae*等の菌株、更には、PHA合成酵素群の遺伝子を導入した*Alc*



*aligenes eutrophus* AC32 (FERM P-15786) (J. Bacteriol., 179, 4821-4830頁 (1997)) 等がより好ましく、これら微生物を適切な条件で培養して菌体内にPHAを蓄積させた微生物菌体を用いられる。その培養方法については特に限定されないが、例えば特開平05-93049等に挙げられる公知の方法が用いられる。

#### 【0017】

本発明におけるPHAとは、ヒドロキシアルカン酸の重合体の総称であり、ヒドロキシアルカン酸成分としては特に限定されないが、具体的には、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) のホモポリマーや、3HBと他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体、またはD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) を含む3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体などが挙げられる。なかでもモノマー成分として3HHを含む重合体、例えば、3HBと3HHとの2成分共重合体 (Macromolecules, 28, 4822-4828 (1995)) または、3HBとD-3-ヒドロキシバレレート (3HV) と3HHとの3成分共重合体 (特許第277757号, 特開平08-289797号) が、得られるポリエステルの物性の面からより好ましい。ここで3HBと3HHの2成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、3HHユニットを1~99モル%といった組成比のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニットの含量は1~95モル%、3HVユニットの含量は1~96モル%、3HHユニットの含量は1~30モル%といった範囲のものが好適である。

#### 【0018】

処理される微生物菌体内のPHA含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥菌体中に20重量%以上のPHAが含有されているのが好ましく、アルカリ処理、物理的破碎処理、分離操作、分離ポリマーの純度等を考慮すると50重量%以上のPHAが含有されているのが特に好ましい。

#### 【0019】

本発明における微生物菌体の懸濁液とは、培養終了後の培養懸濁液そのまま、または、培養液から遠心分離等で分離した菌体を水に懸濁させた水性の懸濁液である。ここでの菌体の懸濁濃度は、乾燥菌体換算で500 g/l以下が好ましく、さらに好ましくは300 g/l以下である。

#### 【0020】

本発明で使用するアルカリとしては、pHを所定の範囲に調整できるものであれば特に限定されるものではないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等を含めたアルカリ金属の水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属の炭酸水素塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の有機酸のアルカリ金属塩、ホウ砂等のアルカリ金属のホウ酸塩、リン酸3ナトリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸3カリウム、リン酸水素2カリウム等のアルカリ金属のリン酸塩、あるいはアンモニア水等が挙げられるがこれらに制限されるものではない。この中でも、工業生産に適し、また価格の点で、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムなどが好ましい。

#### 【0021】

本発明における物理的破碎処理とは、超音波による破碎、乳化分散機、高圧ホモジナイザーやミル等による破碎が挙げられる。用いる高圧ホモジナイザーとしては、独国APV・ゴーリン社製のマントンゴーリン、デンマークAPVラニー社製のミニラボ、米国Microfluidics社製のマイクロフルイタイザー等を用いることができ、ミルとしてはスイスWilly A. Bachofen社製のダイノミル等を用いることができ、乳化分散機としては、英国シルバーソン社製シルバーソンミキサー、日本国エムテック社製クリアーミックス、日本国エバラ社製エバラマイルダー等を用いることができるが、アルカリ処理により菌体内より溶出し、主に粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎し、かつ、菌体細胞壁や細胞膜や不溶性蛋白質などのポリマー以外の不溶性物質を十分に分散できるものであればこれらに限定されるものではない。また、これらのうち2種類以上の破碎機を同時または順次用いることにより更にポリマーの純度を向上させることができる。

## 【0022】

本発明においては、PHA含有微生物菌体の懸濁液を攪拌しながら、上記アルカリ添加と物理的破碎を同時に行うことが重要である。アルカリ処理によって、微生物菌体からPHAと一緒に核酸や菌体細胞壁、細胞膜、不溶性蛋白質などの不溶性物質が流出する。この時、物理的破碎処理を同時に行うことで菌体を完全に破碎し、流出成分を細分化し、粘度の上昇を防ぐとともに、不溶性物質のアルカリ可溶化を進め、PHAの収率を向上させることが可能となる。

## 【0023】

本発明においては、上記アルカリ添加時にpHをコントロールすることが好ましく、より好ましくは、pH9～13.5、更に好ましくはpH10～12の範囲でコントロールするのが好ましい。pHが13.5以上ではPHAの分解が激しく、pHが8以下ではPHAの分離効果は低い。コントロールするpHの上下幅としては設定値の上下それぞれ1以内が好ましく、更に好ましくは上下それぞれ0.5以内である。

## 【0024】

本発明においては、上記のようにpHをコントロールするためにアルカリを連続的あるいは断続的に添加するのが好ましい。

## 【0025】

微生物菌体からのPHAの分離精製において、従来の微生物菌体に対してアルカリを添加する方法では一度にアルカリを添加するために、添加直後は一旦高濃度のアルカリがPHAと接触することになりPHAの低分子化が起きたり、反応が進むにつれアルカリが消費されてpHが低下し効率的な抽出を最後まで行えなかったりしやすい。また、微生物菌体に対してある規定量のアルカリを添加する方法では、微生物菌体懸濁液に含まれる培養液成分などが酸性物質の場合にはそれと反応したり、緩衝状態となったりして、目的を達成しないこともあり得る。それに対し、本発明の好ましい方法ではpHをコントロールしながら連続的あるいは断続的にアルカリを添加するので、常にアルカリ濃度は一定であり、低分子化を招くことなく効率的なPHAの分離を行える。また、アルカリの絶対量ではなくpHによって適宜アルカリの添加量は調整されるので、微生物の培養条件や

その微生物菌体懸濁液中の副成分の影響を受けることなく、再現性のある結果を得ることが可能である。

#### 【0026】

pHコントロールの点においても、物理的破碎処理とアルカリ添加を同時に行うことは必要である。アルカリ処理時に物理的破碎を同時に行わない場合には、上述したように菌体懸濁液の粘度が上昇し、攪拌が困難となりpHコントロールを行うことが出来なくなる。従って、添加したアルカリの濃度分布が生じ、アルカリ濃度の高い部分が存在することで、PHAの低分子化が引き起こされることになる。

#### 【0027】

本発明においては、PHA含有微生物菌体からPHAを分離する工程において、従来のように、物理的破碎処理とアルカリ添加を高温で実施する必要はない。むしろ、アルカリ状態における高温処理はPHAの低分子化を引き起こす要因となるため、好ましくない。本発明における物理的破碎処理とアルカリ添加の好ましい温度条件は、室温から50℃の範囲であり、より好ましくは30℃から40℃の範囲である。

#### 【0028】

図1(a)および(b)は、本発明のPHAの分離精製を実施するための微生物菌体の破碎装置の一例の概略図である。勿論本発明はこれら装置例に限定されるものではない。

#### 【0029】

符号1は全体で本発明の菌体破碎装置を示している。図1(a)および(b)における符号6はアルカリの薬剤を貯留するためのpH調整剤貯留槽であり、該pH調整剤貯留槽6内の薬剤が、ポンプ4によって管路5を介して菌体破碎槽11に供給され、菌体破碎槽11内の微生物懸濁液のpHを調整する。さらに、菌体破碎槽11にはpH調整剤貯留槽6より供給されたpH調整剤を、菌体破碎槽11内の菌体懸濁液に均一に攪拌混合するための攪拌装置2が付設されている。また、菌体破碎槽11には、菌体破碎槽11内の菌体懸濁液のpHを検知して、所定のpHとなるように、ポンプ4の供給量を制御するために、pH計7とpH

検知制御装置から構成される pH 検知制御手段が付設されている。

### 【0030】

図1 (a) において、菌体破碎槽 11 内の菌体懸濁液は、ポンプ 10 を介して破碎装置 9 に供給され、該破碎装置 9 により微生物菌体由来の粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎し、管路 8 を介して菌体破碎槽 11 内へ供給するようになっている。それによって菌体破碎槽 11 内の菌体懸濁液の粘度が低下し、攪拌装置 2 によって菌体懸濁液が均一となり、菌体懸濁液の pH を厳密に調整できるようにになっている。

### 【0031】

図1 (b) においては、破碎装置 12 は菌体破碎槽 11 内に付設されており、外破碎槽 11 内で該破碎装置 12 により微生物菌体由来の粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎するようになっている。また、破碎装置 12 により核酸の破碎を行うと同時に、該菌体懸濁液を均一に攪拌する能力を有するものであるならば、(b) における攪拌装置 2 は省略することが出来る。

### 【0032】

本発明の分離方法によって得られた PHA は、そのままでも高純度であるが、目的に応じて、公知の精製方法、例えば、リゾチーム等の溶菌酵素（特公平 4-61638 号）、トリプシンやプロナーゼ等の蛋白質分解酵素（特開平 5-336982 号）、過酸化水素等の過酸化物（特表平 8-502415 号）等を作用して、更にポリマー純度を向上させることができる。

### 【0033】

#### 【実施例】

本実施例で用いた微生物は、アエロモナス・キャビエ由来の PHA 合成酵素群遺伝子を導入したアルカリゲネス・ユウトロファス AC32（寄託番号 FERM P-15786）である。これを、J. Bacteriol., 179, 4821-4830 頁（1997）に記載の方法で培養し、平均分子量 100 万のポリ（D-3-ヒドロキシブチレート-co-D-3-ヒドロキシヘキサノエート）〔以下 p（3HB-co-3HH）と略称する〕を約 60 wt % 含有した菌体を得た。次にこれを遠心（5000 rpm、10 min）によって培養液か

ら分離し、このペースト状菌体に水を加えて50 g 菌体/1の水性懸濁液とした。この水性懸濁液を用いて、以下に示す実施例を行ったが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

#### 【0034】

菌体から分離して得られたp (3HB-co-3HH)の純度は、以下のようにして決定した。菌体より分離して得られた沈殿物10 mgを、クロロホルム1 mlに溶解したのち、メタノール0.85 mlと濃硫酸0.25 mlを加えて100℃で140分間処理した。これを冷却後、硫酸アンモニア飽和水溶液0.5 mlを加えて激しく攪拌して静置し、下層部をキャピラリーガスクロマトグラフィーにて分析して、分離物中のp (3HB-co-3HH)の純度を求めた。菌体から分離して得られたp (3HB-co-3HH)の分子量は、菌体より分離して得られた沈殿物10 mgを、クロロホルム1 mlに溶解したのち、不溶物を濾過により除いた。この溶液を東ソー社製TSK-GEL GMHXL (7.8 \* 300 mm、2本連結)を装着したSHIMADZU社製GPCシステムを用いクロロホルムを移動相として分析した。

#### 【0035】

##### (実施例1)

p (3HB-co-3HH)含有菌体の該懸濁液500 mlを作成し、pH電極とシルバーソンミキサーを装着した1 Lの反応容器に入れ35℃に保温した。pH電極は丸菱バイオエンジニアリング社製ラボコントローラーMDL-6C型に接続し、該懸濁液のpHが設定値以下になるとペリスタポンプが作動し水酸化ナトリウム水溶液が設定値に達するまで該懸濁液内に入るように設定した。これは、図1の(b)タイプの菌体破碎装置に相当する。シルバーソンミキサーの回転数を3000回転に設定し、ラボコントローラーのpHを11.8に設定し2時間攪拌を行った(この間1規定水酸化ナトリウム40 mlを必要とした)。処理後の懸濁液を遠心分離(3000 rpm、10 min)して沈殿物を得た。沈殿物は水で1回、メタノールで2回洗浄し減圧下に乾燥しp (3HB-co-3HH)の粉体を得た。このp (3HB-co-3HH)粉体の純度は92%と高純度であり、平均分子量は87万であった。

## 【 0 0 3 6 】

## (実施例 2)

該懸濁液の pH の調整を炭酸ナトリウムで行うこと、および pH の設定値を 11.0 に設定した以外は、実施例 1 と同様にして操作を行った。その結果、得られた p ( 3 H B - c o - 3 H H ) の粉体の純度は 91 % と高純度であり、平均分子量は 89 万であった。

## 【 0 0 3 7 】

## (実施例 3)

実施例 1 と同様にラボコントローラーの pH を 11.8 に設定し 1 時間攪拌を行った。処理後の懸濁液を独国 A P V ・ゴーリン社製のマントンゴーリンに通して 7 0 0 0 p s i で更に物理的破碎を行った。処理後の懸濁液を遠心分離 ( 3 0 0 0 r p m 、 1 0 m i n ) して沈殿物を得た。沈殿物は水で 1 回、メタノールで 2 回洗浄し減圧下に乾燥し p ( 3 H B - c o - 3 H H ) の粉体を得た。この p ( 3 H B - c o - 3 H H ) 粉体の純度は 99 % と非常に高純度であり、平均分子量は 87 万であった。

## 【 0 0 3 8 】

## (比較例 1)

実施例 1 においてシルバーソンミキサーの代わりにメカニカルスターラー ( 1 0 0 回転 ) を用いて攪拌を行った以外は同様の操作を行った。その結果、アルカリを添加すると懸濁液は粘重となり攪拌することが出来なくなり、正常な pH を測定することが出来なくなった。懸濁液を遠心分離 ( 1 5 0 0 0 r p m 、 1 0 m i n ) したが沈殿物を得ることは出来なかった。

## 【 0 0 3 9 】

## (比較例 2)

実施例 1 においてラボコントローラーで pH の調整を行わず 1 規定水酸化ナトリウム ( 4 0 m l ) を一度に加えてシルバーソンミキサーで 2 時間攪拌を行った以外は同様の操作を行った。その結果、得られた p ( 3 H B - c o - 3 H H ) 粉体の純度は 90 % と高純度であったが、平均分子量は 30 万で低分子化が激しかった。

## 【0040】

## (比較例3)

特開平7-31487号記載の実施例の条件でアルカリ処理を行った。すなわち、p(3HB-co-3HH)含有菌体を40g/lとなるように該懸濁液500mlを作成し、0.1Mの水酸化ナトリウムで4mMおよび8mMに調整し80℃で1時間加熱攪拌した。処理後の懸濁液を室温まで冷却後、遠心分離して沈殿物を得ようとしたが、実施例記載の2700rpmでは沈殿物が得られなかった。そこで、該懸濁液と等量のメタノールを加えて8000rpmで30分間遠心分離を行い沈殿物を得た。沈殿物は水で1回、メタノールで2回洗浄し減圧下に乾燥しp(3HB-co-3HH)の粉体を得た。このp(3HB-co-3HH)粉体の純度は、アルカリ濃度が4mMおよび8mMの時、それぞれ72, 70%であり、平均分子量はそれぞれ87万、65万であった。この結果、この方法により得られるp(3HB-co-3HH)粉体の純度は低く、また、8mMの条件ではポリマーの低分子化が激しいことが判明した。

## 【0041】

## 【発明の効果】

本発明のPHAの分離精製方法は、極めて簡便な分離精製方法によって、高純度のPHAを得ることが可能である。この方法により懸濁液のpHを精密に制御できることがわかりPHAの深刻な分子量低下を防ぐことが出来、収率良く高純度なPHAを得ることができる。従って本発明は微生物によるPHAの工業的生産の効率向上およびコストの低減に大きく寄与するものである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

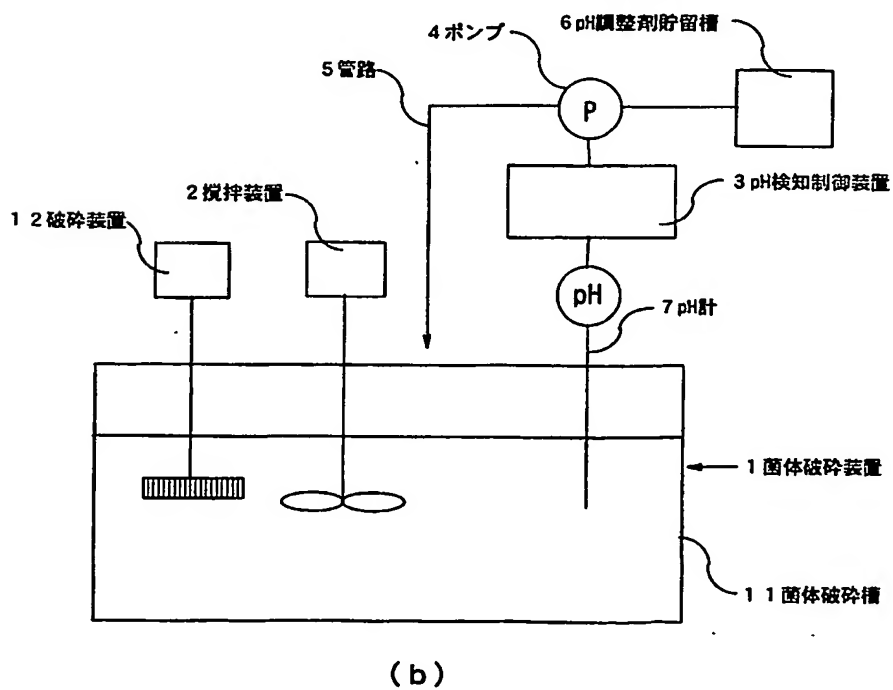
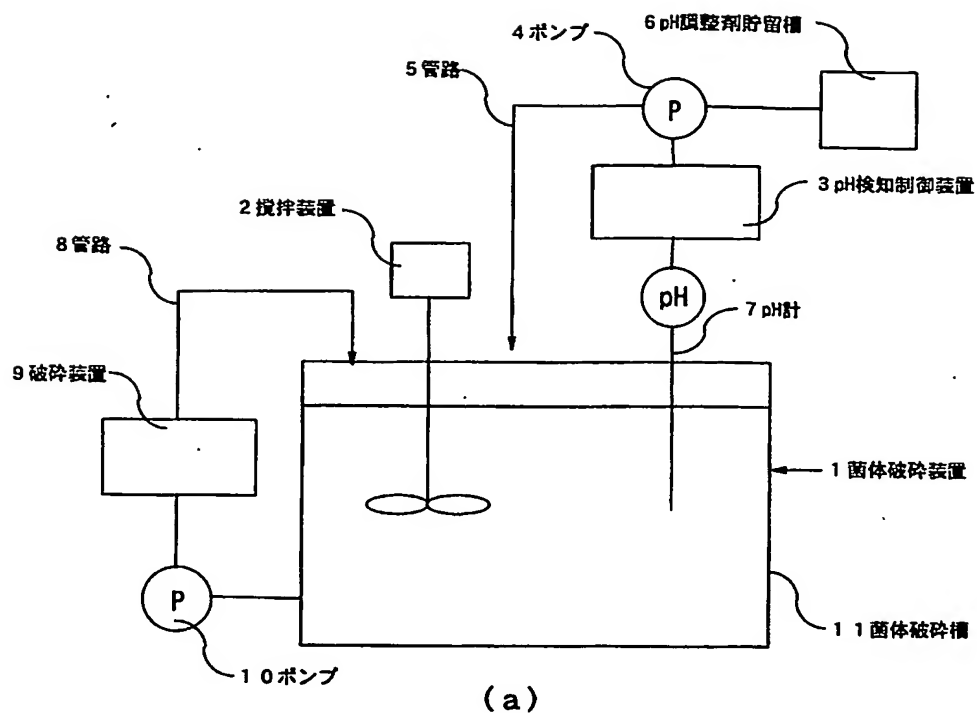
図1(a)および(b)は、本発明のPHAの分離精製を実施するための微生物菌体の破碎装置の一例である。



【書類名】

図面

【図1】



**【書類名】 要約書**

**【課題】** P H A 含有微生物菌体から P H A 以外の菌体構成成分を効率よく除きかつ高純度の P H A を高収率で得るための P H A の分離精製方法を提供すること。

**【解決手段】** ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物から、微生物菌体を破碎してポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を分離する工程において、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液を攪拌しつつ、物理的破碎処理とアルカリ添加を同時に行うことを特徴とする、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造方法。p H を 10～12 の間にコントロールしながら、連続的あるいは断続的にアルカリを添加するのが好ましい。

特願 2002-125881

出願人履歴情報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日  
[変更理由] 新規登録  
住所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏名 鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日 2003年 4月 7日  
[変更理由] 名称変更  
住所変更  
住所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏名 鐘淵化学工業株式会社
3. 変更年月日 2003年 4月 7日  
[変更理由] 名称変更  
住所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
氏名 鐘淵化学工業株式会社